

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Oktober 2005 (06.10.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/092922 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/705

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2005/000455

(22) Internationales Anmeldedatum:
10. März 2005 (10.03.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 015 179.2 25. März 2004 (25.03.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): ONCOMAB GMBH [DE/DE]; Friedrich-Bergius-
Ring 15, 97076 Würzburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VOLLMERS, Heinz
[DE/DE]; Budapesterstrasse 23, 97084 Würzburg (DE).
HENSEL, Frank [DE/DE]; Am Exerzierplatz 1, 97070
Würzburg (DE).

(74) Anwalt: PÖHNER, Wilfried; Röntgenring 4, Postfach 63
23, 97013 Würzburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ANTIGEN OF THE PM-2 ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: ANTIGEN DES PM-2 ANTIKÖRPERS UND DESSEN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a polypeptide, which is expressed on the cell surface as a membrane-bound protein, is gly-
colyzed at one or more points (membrane glycoprotein) and whose amino acid sequence corresponds partially or completely to
that of the integrin binding protein p80 (accession # AJ131720) or REV1 (accession # AF206019). The membrane glycoprotein is
expressed by neoplastic cells and not by non-neoplastic cells and as an antigen specifically binds the human monoclonal antibody
PM-2 (DSM number: DSM ACC2600) and is in addition N-glycosidically and O-glycosidically linked. The invention also relates
to a method for the isolation or production of the antigen and to the use of the latter for producing a medicament for immunization.
The isolated antigen is also used to identify medicaments with an apoptotic or cell-proliferation inhibiting action. The invention also
relates to the use of the membrane glycoprotein as a tumour marker.

(57) Zusammenfassung: Polypeptid, das als membranständiges Protein an der Zelloberfläche exprimiert wird, das an einer oder
mehreren Stellen glykosiliert ist (Membranglykoprotein) und dessen Aminosäuresequenz teilweise oder ganz der des Integrin-Bin-
dungsproteins p80 (accession # AJ131720) oder REV1 (accession # AF206019) entspricht, wobei das Membranglykoprotein von
neoplastischen Zellen und nicht von nicht-neoplastischen Zellen exprimiert wird, und als Antigen den humanen monoklonalen An-
tikörper PM-2 (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) spezifisch bindet, sowie N-glykosidisch und O-glykosidisch glykosiliert
ist. Die Erfindung lehrt außerdem ein Verfahren zur Isolation/Herstellung des Antigens und dessen Verwendung zur Herstellung
eines Arzneimittels zur Immunisierung. Das isolierte Antigen dient auch zur Identifikation von Arzneimitteln mit apoptotischer oder
zellproliferationsinhibierender Wirkung und darüberhinaus der Verwendung des Glykomembranproteins als Tumormarker.

WO 2005/092922 A2

ANTIGEN DES PM-2 ANTIKÖRPERS UND DESSEN VERWENDUNG

5 Die Erfindung betrifft ein Polypeptid, das als membranständiges Protein an der Zelloberfläche exprimiert wird, das an einer oder mehreren Stellen glykosiliert ist (Membranglykoprotein) und dessen Aminosäuresequenz teilweise oder ganz der des Integrin-Bindungsproteins p80 (accession # AJ131720) oder REV1 (accession # AF206019) entspricht.

10 Desweiteren betrifft die Erfindung die Verwendung des erfindungsgemäßen Polypeptids in der Tumorbehandlung, Tumordiagnose und in der Tumorforschung.

15

Hintergrund der Erfindung

Trotz der Fortschritte der Chemotherapie bleibt die erfolgreiche Krebsbehandlung gegenwärtig eine der größten Herausforderungen in der Medizin. Bei diesem Ziel spielt insbesondere die frühe Diagnose von Krebs eine große Rolle. Eine alarmierende hohe Zahl der Krebspatienten befindet sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits in einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit. Neben dem frühzeitigen Nachweis von Tumorzellen im Gewebe spielt natürlich auch die Suche nach neuen Mitteln zur Krebsbekämpfung eine große Rolle, z.B. durch Inhibition der Zellproliferation oder durch Einleitung der Apoptose. Apoptotische Rezeptoren an der Zelloberfläche, wie jene der NGF/TNF-Familie werden prädominant auf Lymphozyten exprimiert, befinden sich aber auch auf verschiedenen anderen Zelltypen, weshalb sie sich nachteiligerweise nicht für eine Krebstherapie eig-

20

25

nen. Insbesondere haben bei *in-vivo*-Tests Liganden und Antikörper für diese Rezeptoren zu Leberschäden geführt.

Tumorspezifische Rezeptoren (Antigene) mit apoptotischer Funktion, die an der Zelloberfläche neoplastischer Zellen exprimiert werden,

5 sind daher für die Krebstherapie besonders wichtig. Das gilt insbesondere vor dem Hintergrund, dass zunehmend die Identifizierung und Isolation humaner monoklonaler Antikörper mit apoptotischer Wirkung gelingt. Durch Einsatz der Hybridomtechnologie ist die Iso-

10 lierung einer Serie tumorspezifischer IgM Antikörper aus dem Gewebe von Krebspatienten sowie aus dem Gewebe gesunder Spender gelungen. Insbesondere konnten bereits zwei humane monoklonale tumorspezifische Antikörper und deren Antigene identifiziert werden.

So bindet der humane monoklonale Antikörper SC-1 spezifisch am CD-55 Rezeptor (Cancer Research, 1999 Oct. 15, 59 (20), 5299-15 5306, Hensel et. al) während der humane monoklonale PAM-1 Antikörper spezifisch am CFR-1 Rezeptor bindet (Oncol. Rep. 2004, Apr. 11 (4), 777-784, Brändlein et. al). Humanen monoklonalen Antikörpern dieser Art wird für die Behandlung und Diagnose von Krebs eine große Rolle zugeschrieben. Ihre Bedeutung für die Krebstherapie liegt in der Induktion von Apoptose und/oder Inhibition der Zellproliferation nach spezifischer Bindung an die entsprechenden Antigene (Rezeptoren) auf der Oberfläche neoplastischer Zellen. 20

Mit Hilfe des humanen monoklonalen Antikörpers PM-2 (DE 102 305 25 156 A1) (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) gelang nun die Identifikation des erfindungsgemäßen Glykomembranproteins, das als Antigen (Rezeptor) den PM-2 Antikörper spezifisch findet. Ein Sequenzvergleich im Rahmen der massenspektroskopischen Analyse (siehe Figur 6) des erfindungsgemäßen Antigens offenbarte die zumindest im untersuchten Bereich vorliegende Homologie zwischen 30

dem erfindungsgemäßen Antigen und einem aus dem Stand der Technik bekannten Protein (NCBI accession # AJ131720), das als p-80 Protein bezeichnet wird bzw. REV1 (accession # AF206019)

5

Definitionen

Apoptose ist der programmierte Zelltod, d. h. Selbstmord von Zellen, durch Fragmentation der DNA, Zellschrumpfung und Dilatation des endoplasmatischen Reticulums, gefolgt von Zellfragmentation und der Bildung von Membranvesikeln, den sog. apoptotischen Körpern. Sie ist die häufigste Todesursache eukaryontischer Zellen und kommt vor in der Embryogenese, Metamorphose und Gewebsatrophie. Die Apoptose garantiert als die physiologische Form des Zelltods eine schnelle und saubere Entfernung unnötiger Zellen, ohne Entzündungsvorgänge oder Gewebeverletzungen auszulösen wie im Falle der Nekrose. Unter pathologischen Bedingungen dient die Apoptose auch zum Entfernen maligner Zellen, wie etwa Krebsvorläuferzellen. Apoptose kann durch verschiedenste Stimuli ausgelöst werden, wie etwa durch zytotoxische T-Lymphozyten oder Zytokine, wie Tumornekrosefaktor, Glykokortikoide und Antikörper.

20

Glykosilierung

Membranglykoproteine weisen auf ihrer extrazellulären Seite Zuckerreste (Glycokalix) auf, die entweder an den Amidstickstoff einer Asparaginseitenkette gebunden sind (*N*-Bindung) oder an das Sauerstoffatom einer Serin- oder Threoninseitenkette (*O*-Bindung). Der direkt mit der Seitenkette verknüpfte Zucker ist meistens N-acetylglucosamin oder *N*-Acetylgalactosamin. Kohlenhydrate können sehr vielfältige Strukturen ausbilden. Zum einen können verschiedene Monosaccharide über eine oder mehrere OH-Gruppen miteinander verknüpft sein. Zum zweiten können die am C-1-Atom

30

ansetzenden Verknüpfungen eine α - oder β -Konfiguration haben. Unter Ausnutzung dieser verschiedenen Verknüpfungen können Glykomembranproteine ausgedehnte aus Oligosacchariden aufgebaute Verzweigungen aufweisen.

5

Es ist bekannt, dass die Kohlenhydratstruktur (Glykosilierungsmuster, Glykokalix) auf der Zelloberfläche Informationscharakter hat für die interzelluläre Erkennung. So benötigt z.B. das Immunsystem das Glykosilierungsmuster zur Erkennung und Adsorption an die Zielzelle, wobei die strukturellen Grundlagen für den Ablauf dieses Vorgangs noch nicht verstanden sind.

10

Integrine sind an die Oberfläche von Zellen gekoppelte Proteine, deren lipophiler Teil die Zellwand durchspannt (Transmembranproteine) und deren extrazelluläre Komponenten glykosiliert sind (Glykomembranproteine). Durch einen als Adhäsion bezeichneten Vorgang vermitteln Integrine die Bindung von Zellen an die extrazelluläre Matrix und an andere Zellen. Für die Selektivität der Bindung ist neben der Aminosäuresequenz der Integrine und der dreidimensionalen Proteinstruktur die Struktur der an die Integrine gebundenen Zucker verantwortlich. Integrine sind Heterodimere, die aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammengesetzt sind, wobei es etwa 10 unterschiedliche α -Untereinheiten und mindestens doppelt so viele unterschiedliche β -Untereinheiten gibt. Die daraus alleine für den Rezeptortyp der Integrine erwachsende Variabilität erklärt, dass die der Zelladhäsion unterliegenden allgemeinen Mechanismen noch bei weitem nicht vollständig verstanden sind. Die Spezifität der Integrin-Bindung wird außerdem durch die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration moduliert. Es ist bekannt, dass Integrine bevorzugt an die Arg-Gly-

15

20

25

Asp-Sequenz (Ruoslahti, Pierschbacher, Science, 1987, 238, 491) der extrazellulären Matrix binden.

5 Unter den Adhäsionsrezeptoren wirken Integrine insbesondere bei der Signaltransduktion, d.h. bei der Informationsübermittlung extrazellulärer Signale in das Innere der Zelle und aus dem Inneren der Zelle nach außen. Durch Adhäsion und nachfolgender Signalübertragung in das Zellinnere werden intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt, die zur Umstrukturierung des Cytoskeletts und zur Induktion von Signalkaskaden führen können. Integrin-Bindungsproteine sind 10 die Bindungspartner der Integrine bei der Adhäsion.

Zelladhäsionsvorgänge wirken regulatorisch auf das Expressionsmuster und damit auf die Spezifität der Rezeptoren selbst. Zell- 15 Adhäsionsmechanismen sind daher wichtig für das Zellwachstum, die Zellmigration und die Differenzierung, insbesondere sind sie beteiligt, wenn Zellen ihre spezialisierten Formen verlieren und zu metastasierenden Krebszellen werden.

20

Neoplastische Zellen

Als Neoplasma oder Tumore wird eine abnorme Gewebsmasse bezeichnet, deren Wachstum autonom (unabhängig von Wachstumsfaktoren), unkoordiniert, ziellos und progressiv ist. Dabei bestehen 25 Tumore aus zwei Komponenten. Zum einen den Parenchymzellen, die auch als neoplastische Zellen bezeichnet werden und dem nicht-tumorösen Stroma, d.h. dem Bindegewebe und den Blutgefäßen. Als neoplastische Zelle wird im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Antigen eine Zelle bezeichnet, die einer unkontrollierten 30 Zellteilung unterliegt oder eine Zelle die keinen Apoptosemechanis-

mus aufweist. Eine neoplastische Zelle im Sinne der Erfindung kann auch beide Störungen aufweisen und kann sich auch dadurch auszeichnen, dass ihr Zell-Zyklus vom normalen Zell-Zyklus abweicht.

5

Beschreibung

Die aus dem Stand der Technik (Wixler et al., FEBS Letters 1999,445,351-355) bekannte Sequenz (accession # AJ131720) codiert für das α -Integrin- Bindungsproteins p80 das mit der proximalen Region des α - Integrins interagiert. Diese Bindungseigenschaften legen nahe, dass es sich bei p-80 um ein membranständiges Protein handeln muss. Angaben zur Glykosylierung des p-80 Proteins sind nicht bekannt.

Das ebenfalls aus dem Stand der Technik bekannte humane REV-1 Protein (accession # AF206019) weist ebenfalls zumindest abschnittsweise Sequenzhomologie zum erfindungsgemäßen Antigen aufweist. Als Funktion von REV1 wird eine Deoxycytidyl-Transferase Aktivität angegeben. Die Deoxycytidyl-Transferase katalysiert vermutlich die Anbindung von Desoxycytidylat an den Tochter-DNA-Strang während der DNA-Replikation im Zellkern. REV1 ist also im Gegensatz zum Integrin bindenden Protein p-80 kein membranständiges Protein und ist im Kern lokalisiert.

Die Tatsache, dass Polypeptide mit gleicher Aminosäuresequenz zum einen als membranständige Proteine und zum anderen als Proteine im Zellkern vorliegen können, zeigt, dass die posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise die Glykosylierung, eine große Rolle im Hinblick auf die Lokalisation und die Funktion eines Polypeptids spie-

len müssen und man trotz Sequenzhomologie nicht von einer Identität solcher Proteine ausgehen kann.

5 Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Identifikation und Charakterisierung eines Antigens an das der tumorspezifische humane monoklonale Antikörper PM-2 bindet (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600), sowie in der Verwendung des Antigens zur Tumorbearbeitung und Tumordiagnose.

10 Der PM-2 Antikörper (DE 102 30 516 A1) ist ein humaner monoklonaler Antikörper mit schweren und leichten Kettenmolekülen, die jeweils einen von Antikörper zu Antikörper konstant und einen von Antikörper zu Antikörper variabel aufgebauten Bereich aufweisen oder
15 eine funktionelles Fragment davon, wobei wenigstens eine der variablen Regionen der leichten Kette substanziell jeweils die in SEQ NO. 4 und/oder die der schweren Kette in SEQ ID NO. 3 des Sequenzprotokolls aufweist. Der PM-2 Antikörper wurde mit Hilfe der Hybridom-Technik hergestellt, wobei die Hybridom-Zellen (DSM ACC2600) durch Fusion der Hetero-Myelom-Zellen HAB-1 sowie
20 deren Subklone mit P-Lymphozyten gewonnen wurde. Die P-Lymphozyten wurden aus einem lymphatischen Organ vorzugsweise, der Milz oder Lymphknoten eines Karzinom-Patienten entnommen. Der humane monoklonale Antikörper PM-2 zeichnet sich dadurch aus, dass er nach spezifischer Bindung an das entsprechende
25 PM-2 Antigen auf der Oberfläche einer neoplastischen Zelle in dieser Zelle Apoptose einleitet und/oder die Zellproliferation inhibiert. Die Apoptotische Wirkung des PM-2 Antikörpers wurde mit Hilfe eines Cell-Death-ELISA Experiments nachgewiesen und ist in Dokument DE 102 30 516 A1 ausführlich beschreiben.

30

Zur Lösung der Aufgabe lehrt die Erfindung ein Glykomembranprotein mit Antigeneigenschaften, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es

- 5 - von neoplastischen Zellen und nicht von nicht-neoplastischen Zellen exprimiert wird, und
- als Antigen den humanen monoklonalen Antikörper PM-2 (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) spezifisch bindet, sowie
- 10 - *N*-glykosidisch und *O*-glykosidisch glykosiliert ist.

Das erfindungsgemäße Antigen ist tumorspezifisch, d.h. es wird nur von neoplastischen Zellen exprimiert. Für die spezifische Bindung des humanen monoklonalen Antikörper PM-2 (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) am erfindungsgemäßen Antigen ist des Glyko-

15 silierung verantwortlich, die *N*-glykosidisch und *O*-glykosidisch ist.

Sowohl beim erfindungsgemäßen Antigen als auch beim zumindest abschnittsweise sequenzgleichen p-80 Protein handelt es sich um

20 membranständige Proteine. Möglicherweise liefert die Tatsache, dass das p-80 Protein Integrin bindet einen Hinweis auf die Rolle, die das erfindungsgemäße Antigen bei der Tumorentstehung spielt. Als Zelladhäsionsmoleküle sind Integrine bei der Angiogenese wichtig. So wird das $\alpha V\beta 3$ -Integrin von den Endothelzellen jener Gefäße

25 exprimiert, die Tumore versorgen. Es wäre denkbar, dass das erfindungsgemäße Antigen, das in den Epithelzellen der Blutgefäße nachgewiesen wurde, ebenfalls mit Integrinen wechselwirkt und seine Hemmung einer der Angiogenesehemmung ähnliche Wirkung hat. Bekannt ist auch, dass Integrine bei der Metastasierung von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielen, indem sie die Adhäsion der über

30

die Blutbahnen transportierten Tumorzellen in bislang tumorfreies Gewebe überhaupt erst ermöglichen.

5 Für die spezifische Bindung des Antikörpers PM-2 haben erfindungsgemäßen Antigen spielen vermutlich die *N*-glykosidisch gebundenen Glykostrukturen eine besondere Rolle. Die genauer Analyse der Glykosylierungsstellen mit Hilfe einer dem Fachmann bekannten Software (Software der Datenbank des „UK MRC Human Genome Mapping Project“

10 <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/GenomeWeb/prot-anal.html>) ermittelt.

Ausgehend von der nur partiell vorliegenden Sequenz (774 Aminosäuren) von p-80 ergab diese Analyse, dass die *N*-Glykosilierung insbesondere an den Aminosäurepositionen 333, 343, 450 und 568 erfolgt. Eine entsprechende Analyse mit der komplett vorliegenden Sequenz der REV1 Proteins ergab, dass bei REV1 insbesondere an den Aminosäurepositionen 810, 830, 927 und 1045 *N*-Glykosilierung vorliegt.

20 Die Anzahl der mit Hilfe des gleichen Verfahrens ermittelten O-Glykosilierungsstellen liegt bedeutend höher.

Es liegt im Rahmen der Erfindung, dass das mit Hilfe des humanen monoklonalen Antikörpers identifizierte Antigen aus einem monomer oder aus mehreren gleichen Untereinheiten aufgebaut ist. Die Möglichkeit, dass es sich um ein Homomer aus zwei gleichen Untereinheiten (Dimer) handelt oder mit anderen Proteinen assoziiert ist, könnte auch erklären, dass das mittels Immuno-Blot (Western-Plot) angegebene Molekulargewicht bislang in einer weiten Bandbreite variiert.

30

Die das Protein exprimierenden Zellen wurden bereits im Zusammenhang mit der Charakterisierung der PM-2 Antikörpers genannt. Daher wird hier auf das Dokument DE 102 305 156 A1 verwiesen. Die Hybridomzelllinie, die den Antikörper PM-2 produziert, ist nach dem Budapester Vertrag über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für doe Zwecke von Patenthinterlegungen am 02.07.2003 unter der Eingangsnummer DSM2600 beim DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig), hinterlegt worden. Für die Charakterisierung des erfindungsgemäßen Antigens wurde insbesondere Pankreas-Karzinomzellen der Zelllinie BXPC3 (ATCC-Nummer CRL1687) verwendet, weil auf deren Oberfläche das Antigen besonders gut exprimiert wird.

Für die Erklärung der immunbiologischen Bedeutung des erfindungsgemäßen Antigens könnte entscheiden sein, dass das Antigen auf der Oberfläche von Epithelzellen im Tumorgewebe exprimiert wird.

Von entscheidender Bedeutung ist das therapeutische Potenzial des erfindungsgemäßen Antigens, das darin besteht, dass nach Bindung des PM-2 Antikörpers an das Antigen in einer neoplastischen Zelle Apoptose induziert wird. Alternativ ist denkbar, dass aufgrund der spezifischen Bindung des PM-2 Antikörpers an das Antigen auf der Oberfläche neoplastischer Zellen deren Zellproliferation inhibiert. Beide Wirkmechanismen sind für die Tumorthherapie interessant.

Im Rahmen der Erfindung wurde ein Verfahren zur Isolation des erfindungsgemäßen Antigens entwickelt. Nach Homogenisierung und Solubilisierung in einem dem Fachmann bekannten Detergenz wird

das Antigen chromatographisch aufgereinigt. Dabei kommt insbesondere die Größen-Ausschluss-Chromatographie (Size-exclusion) zum Einsatz. In einer Verbesserung des Isolationsverfahrens ist denkbar, dass sich an die Größen-Ausschluss-Chromatographie ein
5 weitere Schritt in Form einer Anionen-Austausch-Chromatographie anschließt. Durch diesen zweiten Aufreinigungsschritt wird die Reinheit des isolierten Glykomembranproteins verbessert.

Das derart isolierte Antigen kann zur Herstellung eines Arzneimittels unter Verwendung der üblichen pharmazeutischen Hilfs- und Träger-
10 stoff verwendet werden. Im einfachsten Fall ist die *in-vivo* Verabreichung des aufgereinigten Antigens in einer physiologischen NaCl-Lösung vorgesehen.

Es liegt jedoch ebenso im Rahmen der Erfindung, dass das aufgereinigte Glykomembranprotein als Antigen eingesetzt wird, um spezifisch bindende Liganden oder Adhäsionspeptide zu identifizieren.
Prinzipiell ist denkbar, dass die auf diese Weise identifizierten Polypeptide nur abschnittsweise der Sequenz des humanen monoklonalen Antikörpers PM-2 entsprechen, aber dennoch in neoplastischen
20 Zellen Apoptose einleiten und/oder in diesen Zellen die Zellproliferation inhibieren. Zur Verstärkung dieser Wirkung können die Adhäsionspeptide oder Liganden mit einem Radionucleotid, einem Cytokinin, einem Cytokin oder einem Wachstuminhibitor gekoppelt sein.

Es denkbar, dass das erfindungsgemäße Glykomembranprotein als Antigen bei der Identifikation von Wirkstoffen im Rahmen eines Hoch-Durchsatz-Screenings eingesetzt wird. Derartige Verfahren und deren Ausgestaltungen sind dem in der pharmazeutischen For-
30 schung tätigen Fachmann bekannt.

Im Rahmen der Erfindung ist auch die Verwendung des erfindungs-
gemäßen Antigens als Tumormarker vorgesehen. Dabei ist der
Nachweis des erfindungsgemäßen Membranglykoproteins auf der
5 Oberfläche neoplastischer Zellen mit Hilfe des PM-2 Antikörpers
durchführbar. Mit Hilfe des in den Sequenzprotokollen 1 und 2 ange-
geben Vektorinsets gelang u.a. in einem Antisense Experiment der
Nachweis, dass das erfindungsgemäße Membranglykoprotein das
Antigen für den spezifisch bindenden humanen monoklonalen Anti-
körper PM-2 ist.
10

Beispiel 1

Material und Methoden

5 Zellkultur

Zur Gewinnung des Rezeptors wurde die Karzinomzelllinie BXP-3 (ATCC-Nummer CRL1687) verwendet. Für vergleichende Untersuchungen, z.B. Western-Blot-Analyse wurde außerdem die bekannte Magenadenokarzinom-Zelllinie 23132/87 (DSMZ Eingangsnummer DSM201) (Hensel et al. 1999, Int.J.Cancer 81:229-235) eingesetzt. Die Zellen wurden bis zu 80% Konfluenz in RPMI-1640 (PAA, Wien Österreich) ergänzt mit 10% FCS und Penicillin/Streptomycin (1% für beide) gezüchtet. Für die beschriebenen Untersuchungen wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA getrennt und zweifach mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen.

10

15

Präparation von Membranauszügen

Die Isolierung der Membranproteine aus Tumorzellen wurde in der Weise, wie sie durch Hensel et al. (Hensel et al., 1999, Int.J.Cancer 81:229-235) beschrieben wurde, unter Benutzung der Zelllinie BXP-3 durchgeführt. Verkürzt wiedergegeben wurden die zusammenhängenden Tumorzellen zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgelöst und zentrifugiert, und in einem hypotonischen Puffer (20 mM HEPES, 3 mM KCl, 3mM MgCl₂) aufgelöst.

20

25

Nach einer 15 Min. Inkubationszeit auf Eis und einer Ultraschallbehandlung für 5 Min., wurden die Kerne durch Zentrifugieren bei 10.000 g für eine Dauer von 10 Min. pelletiert. Der Überstand wurde für 30 Min. bei 100.000 g in einem Swing-out-Rotor zentrifugiert und hierdurch die Membran pelletiert. Nachdem die Pellets mit dem hypotonischen Puffer gewaschen wurde, wurden sie in einen Membran

30

Lysis Puffer (50 mM HEPES pH 7.4, 0,1 mM EDTA, 10% Glycerol, und 1% Triton X-100) erneut aufgelöst. Ein Protease Inhibitor (Boehringer, Mannheim, Deutschland) wurde allen Lösungen zugeben.

5 **Reinigung des Antigens**

Die Reinigung des Antigens wurde mit Säulenchromatographie unter Verwendung einer Pharmazia (Freiburg, Deutschland) FPLC Einheit durchgeführt. Für die Größenausschluß (Size-Exclusion)-Chromatographie wurde eine Pharmazia Superdex 200 (XK 16/60) Säule mit 5 mg des Membranpräparates geladen und mit einem Puffer A betrieben (100 mM Tris/Cl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 40mM NaCl, 1% Triton X-100). Dann wurde das Eluat fraktioniert und durch Western-Blot Analyse auf Reaktionen mit dem Antikörpern PM-2 untersucht. Die positiven Fraktionen wurden auf einer MonoQ (5/5 Säule) unter Verwendung des Puffers A gegeben. Die gebundenen Proteine wurden mit Hilfe eines linearen Gradienten unter Verwendung des Puffers B (100 mM Tris/ Cl, pH 7.5, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 1 M NaCl, 1% Triton X-100) ausgewaschen, fraktioniert und mit Coomassiegefärbtem SDS-PAGE und Western-Blot Analyse untersucht.

20

Western blotting

Die Auftrennung durch 10 %ige SDS-PAGE Gele und Western blotting der Proteine wurden unter Standardbedingungen, wie anderweitig beschrieben (Hensel et al., 1999, Int.J.Cancer 81:229-235), durchgeführt. Verkürzt wiedergegeben wurden die geblotteten Nitrozellulose -Membrane mit PBS blockiert, welches 2 % Magermilchpulver enthielt, dem eine einstündigen Inkubation mit 10 µg/ml gereinigtem Antikörper 103/51 folgte. Nach dreimaligem Waschen mit PBS + 0,05% Tween-20 wurde der zweite Antikörper (Peroxidase gekoppelte Hasen antihumane IgM Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutsch-

30

land)) inkubiert. Die Reaktion wurde mit Hilfe des Supersignal Chemilumineszenz kits von Pierce (KMF, St. Augustin, Deutschland) nachgewiesen.

- 5 Die mit Hilfe von Western-Blots auf einem entsprechenden SDC-Gel identifizierten positiven Banden wurden aus dem Gel getrennt und zur MALDI-Analyse genutzt.

MALDI Peptide-Analyse

- 10 Die aus dem SDS-Gel getrennten Proteinbanden wurden in kleine Stücke von etwa 1mm x 1mm zerschnitten. Die Gelstücke wurden gewaschen, mit DTT reduziert, S-Alkyliert mit Iodoacetamid und Trypsin behandelt (unmodifiziert, Sequenzgrad, Boehringer) wie anderweitig beschrieben (Shevchenko et al., 1996b Anal.Chem.
- 15 68:850-858). Nach 3 Stunden der Verdauung bei 37°C wurden 0.3 µl der Lösung entfernt und einer massenspektroskopischen Analyse (MALDI) mit Hilfe eines Bruker Reflex MALDI-TOF unterzogen, welches mit einer nachträglichen Extraktion (Brucker, Franzen, Bremen, Deutschland) ausgerüstet war. Die Dünnschichttechnik wurde zur Pro-
- 20 benpräparierung angewendet (Jensen et al., 1996 Rapid.Comm. Mass.Spectrom 10:1371-1378). Die tryptischen Peptid-Massen wurden dazu verwendet, um nicht redundante Proteinsequenzdaten durch ein Peptid-Suchprogramm, das im Hause entwickelt wurde, zu suchen.

25

Klonierung des p80-Antisense-Vektor und Transfektion

- RNA Isolierung, cDNA Synthese und PCR wurden wie beschrieben (Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer 81:229-235) durchgeführt. Verkürzt wiedergegeben wurde für die Amplifikation eines Fragments mittels
- 30 PCR aus einem Bereich von Position 181 bis Position 681 der

Nukleotid Sequenz von p-80 (accession # AJ131720) folgende Primer benutzt:

5 P80-Rev 3' 5' CTGTTCCATACGATTTTCATGC 3'
P80-Rev 5' 5' TCGAACTGGTCTATCATCCAA 3'

Die Amplifikation wurde mit folgendem Zyklusprofil durchgeführt:
95°C, 2 Min; nachfolgend 35 Zyklen bei 94°C, 30 sec; 60°C, 30 sec;
72°C 60 sec. und abschließend 72 °C, 4 min. Die Klonierung in den
10 pCR- Skript Amp SK (+) Vektor und das Sequenzieren der DNA wurde wie früher schon beschrieben (Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer 81:229-235) durchgeführt.

Das Insert wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen aus dem
pCR- Skript Amp SK (+) Vektor ausgeschnitten und in den pHook-2
15 Vektor (Invitrogen, Leek, Niederlande) subkloniert. Verschiedene Klone wurden durch Sequenzierung auf die erfolgreiche Klonierung untersucht. Es wurde ein Klon gewählt, bei dem die codierende Sequenz in Antisense-Richtung zum Promotor kloniert worden ist. Diese Klon wurde amplifiziert und Vektoren für die Antisense-
20 transfektion isoliert.

Die Transfektion der Zelllinie BXPC-3 mit pHook2-anti PM-2-R wurde mit einem Primefaktor Reagenz (PQLab, Erlangen, Germany) entsprechend dem Lieferantenhandbuch vervollständigt. Dafür wurde
25 die Plasmid DNA auf 10 µg/ml verdünnt und das Primefaktorreagenz im Verhältnis 1:10 einem serumfreien Wachstumsmedium beigegeben. Die verdünnte Plasmid DNA (450 µl), das verdünnte Primefaktorreagenz ergänzend (90 µl) und das serumfreie Wachstumsmedium (460 µl) wurden vermischt und bei Raumtemperatur inkubiert. 60
30 ml Zellkulturschalen (70% konfluent) wurden zweimal mit dem se-

5 rumfreien Wachstumsmedium gewaschen und anschließend die Primefaktor/DNA-Mischung tropfenweise hinzugegeben. Die Zellen wurden inkubiert für 18 Stunden bei 37°C and 7% CO₂, anschließend wurde das serumfreie Wachstumsmedium ersetzt durch ein Wachstumsmedium mit 10% FCS und die Zellen wurden weitere 24 Stunden inkubiert, bevor die Expression des Rezeptorproteins untersucht wurde.

- 10 a) Ein Teil der Zelllinie BXP-3 wurde mit einem Kontrollvektor (p-HOOK-2), ein weiterer Teil mit den p80 Antisense-Vektor transfiziert.
b) 48 h nach der Transfektion wurden Zytospinpreparationen der Zellen angefertigt.
c) Die Zytospinpreparationen wurden mit dem PM-2 Antikörper und einem Kontrollantikörper (nur sekundärer Antikörper) angefärbt
15 d) Zellen, die mit dem p-80 Antisense-Vektor transfiziert sind, zeigen einen deutlichen Abfall in der Bindung des Antikörpers PM-2.

Verdau mit N-Glykosidase auf Zytospins

- 20 Die verwendeten Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA vom Untergrund ihrer Kulturflaschen abgelöst und anschließend zur Regeneration der Membranproteine für 1 h in RPMI-1640 Medium + 10% FCS bei 4°C inkubiert. Danach wurden mit den Zellen Zytospin-Präparate angefertigt. Die Zytospins wurden über Nacht bei RT getrocknet.
25 Nach der Trocknung wurden die Zellen für 10 min mit 100% Azeton fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit 5 mU/ml N-Glykosidase (in 100 µl Phosphatpuffer, pH 7,0) für 3 Stunden bei 37°C im Brutschrank verdaut. Danach wurden die Zytospin-Präparate dreimal mit PBS gewaschen und sofort
30 der immunhistochemischen Färbung mit den verschiedenen Antikör-

5 pern zugeführt. Als Negativkontrolle dienten Zytospins, die nur mit Phosphatpuffer inkubiert wurden, bzw. Zytospins, welche ohne Glykosidase-Behandlung einer normalen immun-histochemischen Färbung unterzogen wurden. Die Färbung erfolgte wie beschrieben. Die fertige Färbung wurde abschließend mikroskopisch ausgewertet und die Ergebnisse mit einer Photoanlage und einem Olympus Mikroskop dokumentiert.

Verdau mit O-Glykosidase auf Zytospins

10 Auch hier wurden die Zellen abtrypsinisiert und für 1 h in Kulturmedium auf Eis rekonstituiert. Nach Präparation der Zytospin-Präparate und anschließender Fixierung wurden die Zellen mit 20 µU/ml O-Glykosidase (in 100 µl Phosphatpuffer, pH 6,8) bei 37°C für 3 h inkubiert. Als Kontrolle wurden Zytospins nur mit Phosphatpuffer inkubiert oder ohne Inkubation normal gefärbt. Die immunhistochemische Färbung erfolgte wie beschrieben.

15

Immunohistochemisches Färben von lebenden Zellen und Azeton-fixierten Zellen

20 Für das Färben lebender Zellen wurden die Zellen herausgelöst, gewaschen und verdünnt auf 1×10^6 Zellen pro ml. 1 ml der Zelllösung werden bei 1.500 g für 5 Min. zentrifugiert. Der auf 40 µg/ml mit vollständigen RPMI verdünnte Antikörper wird zu einem Endvolumen von 1ml ergänzt und für 90 Min. auf Eis inkubiert. Dann werden die Zellen bei 1.500 g für 5 Min. pelletiert und wieder aufgelöst mit 500 µl RPMI. Mit 200 µl der Zelllösung werden die Zytospinpräparate präpariert und für 30 Min luftgetrocknet. Die Zellen werden in Aceton für 30 Min. fixiert und dreimal mit Tris/NaCl gewaschen. Die HRP-gekoppelten Hasen antihumanen IgM (DAKO) werden 1:50 in

25

30

PBS/BSA (0,1%) verdünnt und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wird das Färben, wie oben erwähnt, durchgeführt.

5 Für das Färben der azeton-fixierten Zellen werden die Zytospins präpariert, bei Raumtemperatur luftgetrocknet und, wie oben beschrieben, in Azeton fixiert. Dann werden die Zytospins für 15 Min. mit PBS/BSA (0,1%) blockiert und für 30 Min. mit 10 µg/ml primärer Antikörper inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern und das Färben wird, wie oben beschrieben, durchgeführt.

Beispiel 2

Ergebnis Glykosidase - Verdau

15 Figur 1 zeigt den Einfluss des Glykosidase-Verdau auf die Antikörper-Bindung von PM-2 auf der Zelloberfläche der Pankreaskarzinomzellen BXPC-3. Die Zytospins wurden nach dem Verdau immunhistochemisch mit der Positivkontrolle CAM-Keratin (A, C, E) und mit PM-2 (B, D, F) gefärbt.

20 Die Bilder A und B in Fig. 1 zeigen die Kontrollen nach Inkubation der Zellen in Glykosidase-Puffer ohne Enzym. Die Bilder C und D zeigen die Auswirkungen der N-Glykosidase-Inkubation auf die Bindung des Antikörpers PM-2 an die Pankreaskarzinomzellen. Nach Verdau mit dem Enzym N-Glykosidase kann nicht mehr mit dem Antikörper PM-2 angefärbt werden. Das bedeutet, dass der Antikörper nicht mehr an seinen Rezeptor binden konnte, weil die für die spezifische Bindung erforderliche N-gebundene Glykostruktur beim N-Glykosidase-Verdau abgespalten wurde.

30

Die Bilder in Fig. 1 E und F zeigen die Auswirkungen der O-Glykosidase-Inkubation auf die Bindung des Antikörpers PM-2. Während die Positivkontrolle CAM-Keratin in Bild E keine veränderte Färbung aufweist zeigt sich nach Verdau mit dem Enzym O-Glykosidase, dass die Zellen nicht mehr mit dem Antikörper PM-2 angefärbt werden können. Das legt nahe, dass neben N-gebundenen Zuckern mindestens auch eine O-glykosidisch gebundenen Determinanten des Antigens für die spezifische Bindung des PM-2 Antikörpers verantwortlich war.

Beispiel 3

Ergebnis Antisense Transfektion

Fig. 2 zeigt den Einfluß der Antisense-Transfektion auf Färbungen mit Antikörpern PM-2 und Lebendzellfärbung (Vergrößerung 200x).

Die rechte Spalte von Figur 2 zeigt die mit dem PM-2 angefärbten Zellen der BXPC-3 Zelllinie. In der oberen Reihe sind nicht transfizierte Zellen abgebildet. Die mittlere Reihe zeigt die mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen. In beiden Fällen zeigen die Zellen eine deutliche PM-2 Antikörper Färbung. Diese Färbung nimmt deutlich ab nach Transfektion der Zellen mit dem Antisense-Vektor. Dies zeigt das Bild in der rechten Spalte der unteren Zeile. Dieses Experiment zeigt, dass der PM-2 Antikörper an ein Membranprotein bindet, dessen Aminosäuresequenz zur Aminosäuresequenz des P-80 Proteins zumindest abschnittsweise homolog sein muss.

Zusammen mit dem Ergebnis des Glucosidase-Verdaus zeigt dies, dass ein Glycomembranprotein, dessen Aminosäuresequenz zumin-

dest teilweise mit der des P-80 Proteins übereinstimmt, das Antigen ist, an das der PM-2 Antikörper spezifisch bindet.

Beispiel 3

5 Ergebnis Westernblot

Figur 3 zeigt den immunspezifischen Nachweis des in BXPC-3-Zellen und in 23132/87-Zellen exprimierten Antigens mit Hilfe des PM-2 Antikörpers.

10 Beispiel 4

Bestimmung der N-Glykosilierungsstellen

Die in Figur 4a und 4b sowie 5a und 5b angegebenen Glykosilierungsstellen wurden mit Hilfe der Software der Datenbank des „UK MRC Human Genome Mapping Project“

15 (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/GenomeWeb/prot-anal.html>) ermittelt.

Beispiel 5

MALDI-Analyse des PM-2 Antigens

20 Figur 6 zeigt das Ergebnis der massenspektroskopischen Analyse einer aus einem SDS-Gel mit Hilfe des PM-2 Antikörpers selektierten Proteinbande. Ein Sequenzvergleich der mit Hilfe des Massenspektrometers ermittelten Peptidabschnitte Nr. 2, Nr. 3, Nr. 4 und Nr. 6 Sequenzhomologie zum p-80 Protein bzw. zum REV1 Protein aufweisen.

25

Patentansprüche

- 5 1. Polypeptid, das als membranständiges Protein an der Zelloberfläche exprimiert wird, das an einer oder mehreren Stellen glykosiliert ist (Membranglykoprotein) und dessen Aminosäuresequenz teilweise oder ganz der des Integrin-Bindungsproteins p80 (accession # AJ131720) oder REV1 (accession # AF206019) entspricht, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Membranglykoprotein
- 10 - von neoplastischen Zellen und nicht von nicht-neoplastischen Zellen exprimiert wird, und
- als Antigen den humanen monoklonalen Antikörper PM-2 (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) spezifisch bindet, sowie
- 15 - *N*-glykosidisch und *O*-glykosidisch glykosiliert ist.
- 20 2. Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die spezifische Bindung des humanen monoklonalen Antikörpers PM-2 (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) am Membranglykoprotein durch einen oder mehrere *N*-glykosilierte Carbohydrat-Rest (=Zucker-Rest) vermittelt wird.
- 25 3. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens an einer der Aminosäurepositionen 333, 353, 450 und 568 der partiellen Sequenz (accession #
- 30 AJ131720) des p-80 Antigens eine *N*-Glykosilierung vorliegt.

- 5
4. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens an einer der Aminosäurepositionen 810, 830, 927 und 1045 der partiellen Sequenz (accession # AF206019) des REV1 Antigens eine *N*-Glykosilierung vorliegt.
- 10
5. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Membranglykoprotein ein Monomer ist oder aus mehreren gleichen Untereinheiten aufgebaut oder mit anderen Proteinen assoziiert ist.
- 15
6. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Molekulargewicht des Membranglykoproteins ca. 80 bis 160 kDa beträgt.
- 20
7. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Membranglykoprotein von den neoplastischen Zellen
- des Dickdarms
 - der Bauchspeicheldrüse
 - der Prostata
 - der Gebärmutter,
 - dem Eileiter,
 - 25 - der Nebenniere und/oder
 - der Lunge, sowie vom
 - Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre oder der Lunge,
 - des Magenkarzinoms und
 - dem duktalem Karzinom der Brust
- 30 und nicht von nicht-neoplastischen Zellen exprimiert wird.

- 5 8. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Membranglykoprotein auf der Oberfläche der Pankreas-Karzinomzelllinie BXPc-3 (ATCC-Nummer CRL1687) exprimiert werden.
- 10 9. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Membranglykoprotein insbesondere auf der Oberfläche von neoplastischen Epithelzellen exprimiert wird.
- 15 10. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass nach Bindung des PM-2 Antikörpers (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) am Membranglykoprotein an einer neoplastischen Zelle in dieser Zelle und nicht in nicht-neoplastischen Zellen Apoptose induziert wird.
- 20
- 25 11. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass nach Bindung des PM-2 Antikörpers (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) an einer neoplastischen Zelle über das Membranglykoprotein in der Zelle die Zellproliferation inhibiert wird.

12. Verfahren zur Gewinnung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Membranglykoproteins aus

- Membranextrakten der Pankreas-Karzinomzelllinie BXP-3 durch
- Solubilisierung und
- nachfolgenden Einsatz der Größenausschluss-Chromatographie isoliert wird.

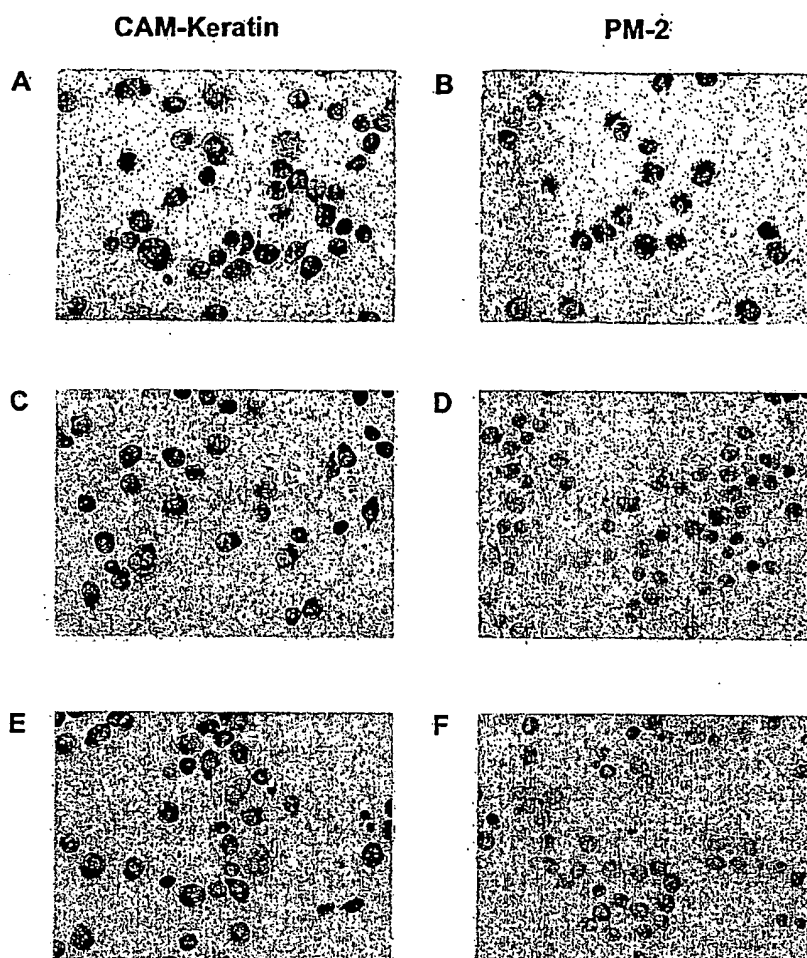
13. Verfahren zur Gewinnung des Polypeptids nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass sich an die Größenausschluss-Chromatographie die Durchführung einer Anionenaustausch-Chromatographie anschließt.

14. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur der Herstellung eines Arzneimittels unter Verwendung der üblichen pharmazeutischen Hilfs- und Trägerstoffe, das der Bekämpfung von Tumoren durch Immunisierung nach *in vivo* Verabreichung dient.

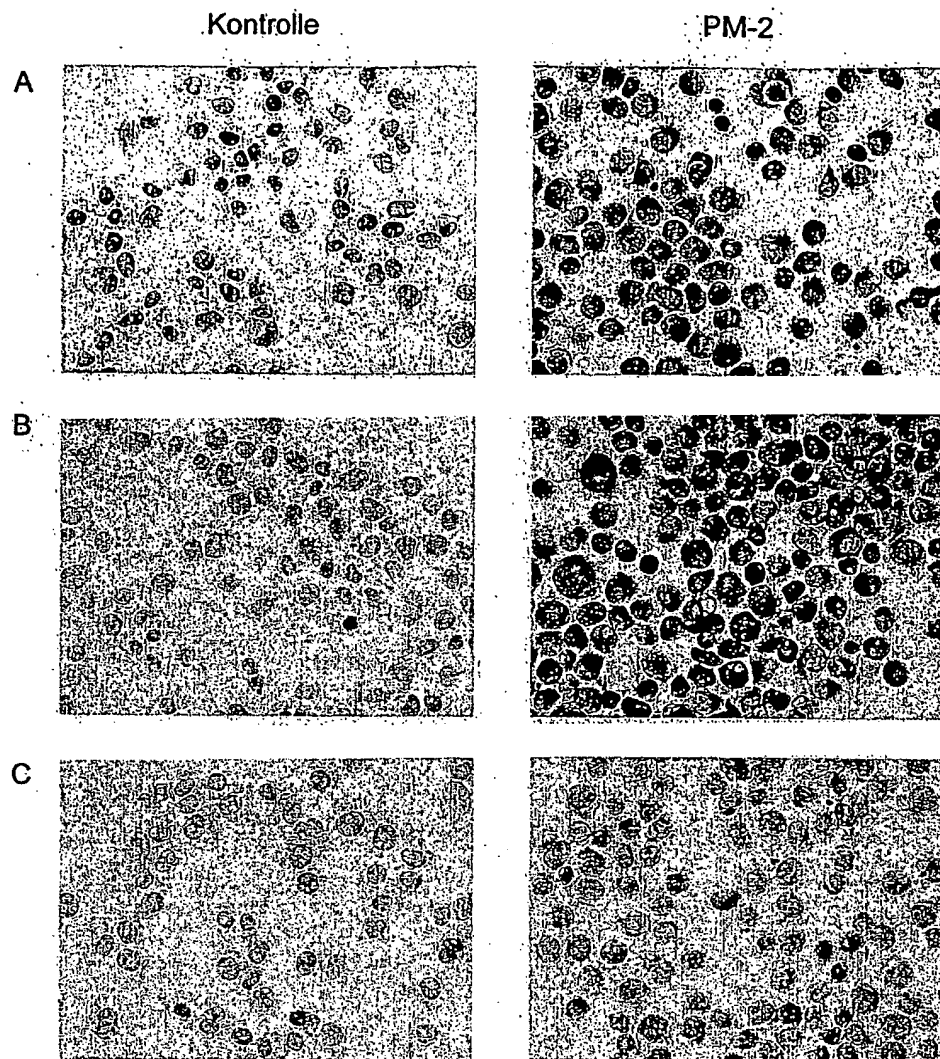
15. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Entwicklung spezifisch bindender Liganden oder Adhäsionspeptiden mit apoptotischer und/oder zellproliferation-sinhibierender Wirkung gegenüber neoplastischen Zellen.

- 5 16. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Entwicklung spezifisch bindender Liganden oder Adhäsionspeptiden, wobei an den Liganden oder an das Adhäsionspeptid ein Radionucleotid, ein Fluoreszenz-Marker, ein Cytokin, ein Cytokine oder eine Wachstuminhibitor gekoppelt ist.
- 10 17. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Suche von Wirkstoffen in einem Hoch-Durchsatz-Screens (High-Throughput-Screening - HTS).
- 15 18. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche als Tumormarker.
- 20 19. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche zu Diagnosezwecken, **dadurch gekennzeichnet**, dass über die spezifische Bindung des PM-2 Antikörpers (DSM Eingangsnummer: DSM ACC2600) an das Membranglykoprotein ein Nachweis der Existenz, der Lokalisierung und/oder der Menge des Antigens führbar ist.
- 25 20. Antisense-Vektor, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Teil der Aminosäuresequenz des Vektors der in SEQ NO ID:1 angegeben Sequenz entspricht.

21. Antisense-Vektor, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Teil der Nucleotidsequenz des Vektors der in SEQ NO ID:2 angegeben Sequenz entspricht.



Figur 1

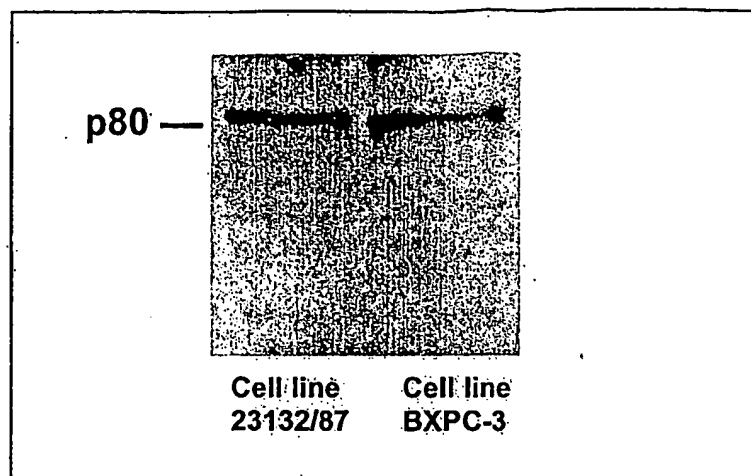


A: BXPC-3 Zellen untransfiziert

B: BXPC-3 Zellen transfiziert mit Vektor

C: BXPC-3 Zellen transfiziert mit antisense-Vektor

Figur 2



Figur 3

Bestimmung potentieller Glykosylierungsstellen der partiellen Sequence des
humanen alpha -integrin binding protein p80

Bestimmt durch eine Suche in der Datenbank des „UK MRC Human Genome Mapping Projects“, <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/GenomeWeb/prot-anal.html>

```

GKADIPDSSL WENPDSAQAN GIDSVLSRAE IASCSYEARQ LGIKNGMFFG      50
HAKQLCPNLQ AVPYDFHAYK EVAQTLYETL ASYTHNIEAV SCDEALVDIT      100
EILAETKLTTP DEFANAVRME IKDQTKCAAS VGIGSNILLA RMAIRKAKPD      150
GOYHLKPEEV DDFIRGQLVT NLPGVGHSME SKLASLGIKT CGDLQYMTMA      200
KLQKEFGPKT GOMLYRFCRG LDDRPVITEK ERKSVSAEIN YGIRETQPKKE      250
AEAFLLSLSE EIQRRLATG MKGKRLTLKI MVRKPGAPVE TAKFGGHGIC      300
DNIARTVTLD QATDNAKIIG KAMLMFHTM KLNISDMRGV GIHVNLVPT        350
NLNFTCPSPR PSVQSSHFPS GSYSVRDVFQ VQKAKKSTEE EHKEVFRAAV      400
DLEISSASRT CTFLPPFPAH LPTSPDTNKA ESSGKWNGLH TPVSVQSRLN      450
LSIEVPSPSQ LDQSVLEALP PDLREQVEQV CAVQQAESHG DKKKEPVNGC      500
NTGILPQPVG TVLLQIPEPQ ESNSDAGINL IALPAFSQVD PEVFAALPAE      550
LQRELKAAYD QRQRQGENST HQQSASASVP KNPLLHLKAA VKEKKRNKKK      600
KTIGSPKRIQ SPLNNKLLNS PAKTLPGACG SPQKLIDGFL KHEGPPAEKP      650
LEELASTSG VPGLSSLQSD PAGCVRPPAP NLAGAVEFND VKTLLREWIT      700
TISDPMEEDI LQVVKYCTDL IEEKDLEKLD LVIKYMKRLM QQSVESVWNM      750
AFDFILDNVQ VVLQQTGSGT LKVT                                     774

```

Es kann anhand der Aminosäuresequenz vorhergesagt werden, daß das Molekül p80 4 potentielle N-Glykosylierungsstellen besitzt

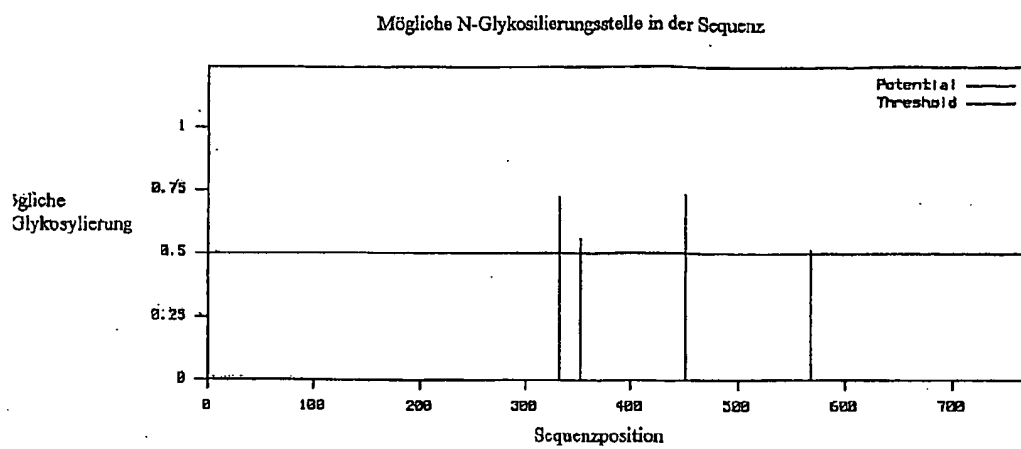
Diese Stellen sind an den folgenden Aminosäurepositionen:

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	NGlyc result	
Sequence	333 NISD	0.7279	(9/9)	++	
Sequence	353 NPST	0.5604	(5/9)	+	WARNING: PRO-X1.
Sequence	450 NLSI	0.7334	(9/9)	++	
Sequence	568 NSTH	0.5163	(4/9)	+	

Die Analyse zeigt, dass die wahrscheinlichsten Glykosylierungsstellen an den Positionen Nummer 333, 353, 450 sind

Figur 4a



Figur 4b

Bestimmung potentieller N-Glykosylierungsstellen des humanen REV-1 Proteins

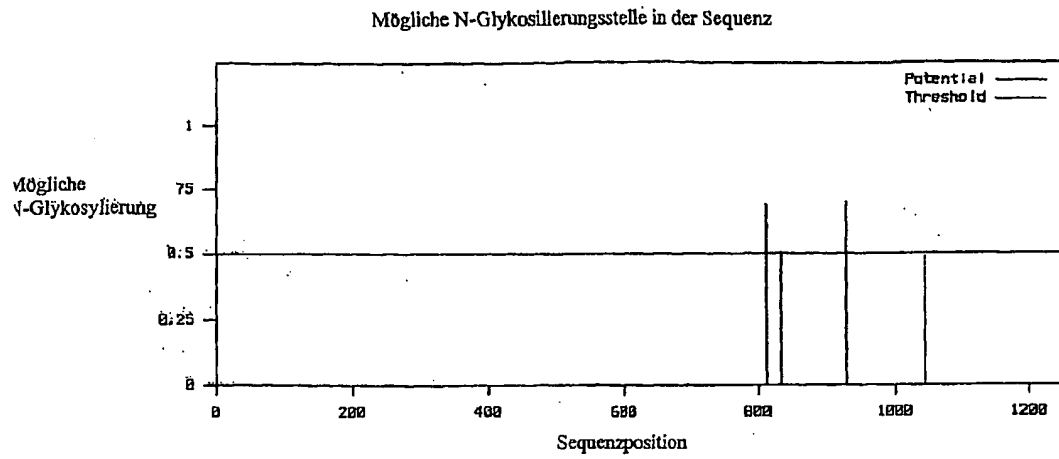
Bestimmt durch eine Suche in der Datenbank des „UK MRC Human Genome Mapping Projects“, <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/GenomeWeb/prot-anal.html>

Name:	Sequence	Length:	1251	
MRRGGWRKRA	ENDGWETWGG	YMAAKVQKLE	EQFRSDAAMQ	KDGTSSSTIFS 50
GVAIYVNGYT	DPSAEELRKL	MMLHGGQYHV	YYSRSKTTHI	IATNLPNAKI 100
KELKGEKVIR	PEWIVESIKA	GRLLSYIPYQ	LYTKQSSVQK	GLSFNPVCRP 150
EDPLPGPSNI	AKQLNNRVNH	IVKKIETENE	VKVNGMNSWN	EEDENNDFFS 200
VDLEQTSPGR	KQNGIPHPRG	STAI FNHGTP	SSNGALKTQD	CLVPMVNSVA 250
SRLSPAFSQE	EDKAEKSSD	FRDCTLQQLQ	QSTRNTDALR	NPHRTNSFSL 300
SPLHSNTKIN	GAHSTVQGP	SSTKSTSSVS	TFSKAAPSV	SKPSCDNFIS 350
NEYSHSRLHH	ISMWKCELTE	FVNTLQRQSN	GIFPGREKLK	KMKTGRSALV 400
VTDTGDMSVL	NSPRHQSCIM	HVDMDCFFVS	VGIRNRPDLD	GKPVAVTSNR 450
GTGRAPLRPG	ANPQLEWQYY	QNKILKGKAA	DIPDSSLWEN	PDSAQANGID 500
SVLSRAEIAS	CSYEARQLGI	KNGMFFGHAK	QLCPNLQAVP	YDFHAYKEVA 550
QTLIYETLASY	THNIEAVSCD	EALVDITEIL	AETKLTPEDE	ANAVRMEIKD 600
QTKCAASVGI	GSNILLARMA	TRKAKPDGQY	HLKPEEVDDF	IRGQLVTNLP 650
GVGHSMESKL	ASLGIKTCGD	LQYMTMAKLQ	KEFGPKTGQM	LYRFRCGLDD 700
RPV RTEKERK	SVAEINYGI	RFTQPKAEAE	FLLSLSEEIQ	RRLEATGMKG 750
KRLTLKIMVR	KPGAPVETAK	FGGHGICDNI	ARTVTLDQAT	DNAKIIGKAM 800
LNMFTMTKLN	ISDMRGVGIH	VNQLVPTNLN	PSTCPSRPSV	QSSHFPDGSY 850
SVRDVFQVQK	AKKSTEEHKK	EVFRAAVDLE	ISSASRTCTF	LPPFPAHLPT 900
SPDTNKAESS	GKWNLHTPV	SVQSRNLNSI	EVPSPSQLDQ	SVLEALPDDL 950
REQVEQVCAV	QQAESHGDKK	KEPVNGCNTG	ILPQPVGTVL	LQIPEPQESN 1000
SDAGINLIAL	PAFSQVDPEV	FAALPAELQR	ELKAAVDQRQ	RQGENSTHQQ 1050
SASASVPKNP	LLHLKAAVKE	KKRNKKKKTI	GSPKRIQSPL	NNKLLNSPAK 1100
TLPGACGSPQ	KLIDGFLKHE	GPPAEKPLEE	LSASTSGVPG	LSSLQSDPAG 1150
CVRPPAPNLA	GAVEFNDVKT	LLREWITTIS	DPMEEDILQV	VKYCTDLIEE 1200
KDLEKLDLVI	KYMKRLMQQS	VESVWNMAFD	FILDNVQVVL	QQTYGSTLKV 1250

(Threshold=0.5)

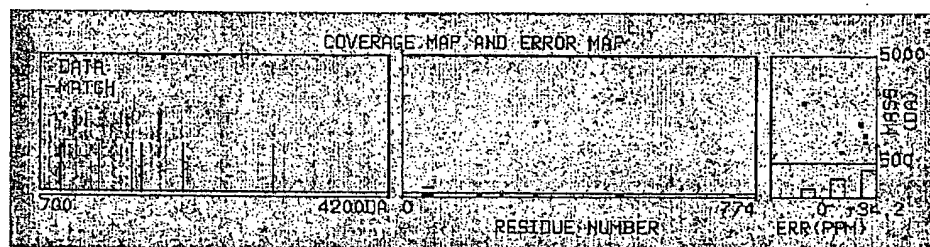
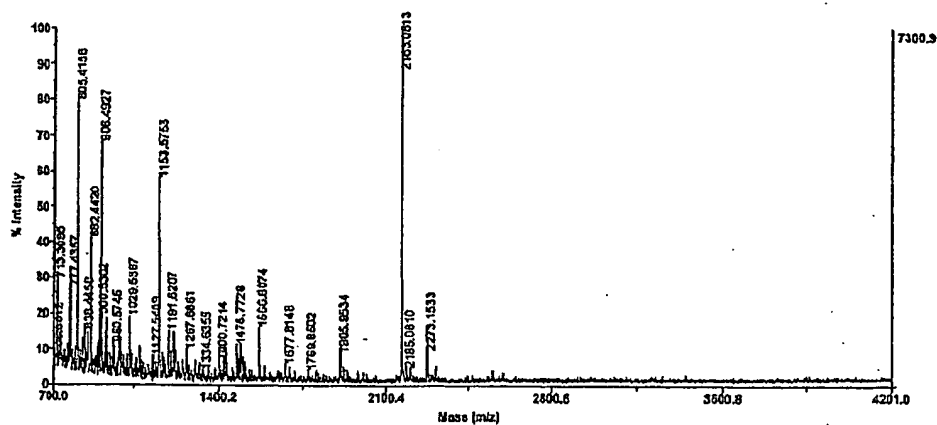
SeqName	Position	Potential	Jury agreement	NGlyc result	
Sequence	810 NISD	0.6898	(9/9)	++	
Sequence	830 NPST	0.5101	(4/9)	+	WARNING: PRO-X1.
Sequence	927 NLSI	0.7031	(9/9)	++	
Sequence	1045 NSTH	0.4883	(6/9)	-	

Figur 5a



Figur 5b

MALDI-Analyse des PM-2 Antigens



Note: click on the symbol to change column format.

Measured Avg/	Computed Error	<input checked="" type="checkbox"/> Residues Missed
----------------------	-----------------------	--

Mass (M)	Nono	Mass	δ (ppm)	Start	To	Cut	Peptide sequence
----------	------	------	----------------	-------	----	-----	------------------

Nr. 1	926.505	M	926.493	13	220	227	0	GLDDRRPV
Nr. 2	1315.646	M	1315.609	28	294	303	0	FGGEGTCDNIAR
Nr. 3	1654.822	M	1654.775	28	716	728	1	YCTDLIEKDLK
Nr. 4	1752.901	M	1752.882	11	166	182	0	QLVZNLPGVGHSMESK
Nr. 5	2169.065	M	2169.011	25	473	493	1	EQVEQVCAVQCQSHCKCK
Nr. 6	3052.411	M	3052.446	-12	45	70	1	NGHFGHARGLCPNQLVPYDFHAYK

- Nr. 1 = Keine Homologie gefunden
Nr. 2 = Homolog zum alpha-integrin binding protein p80
Nr. 3 = Homolog zum alpha-integrin binding protein p80
Nr. 4 = Homolog zum alpha-integrin binding protein p80
Nr. 5 = Keine Homologie gefunden
Nr. 6 = Homolog zum alpha-integrin binding protein p80

Figur 6

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Oktober 2005 (06.10.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/092922 A3

(51) Internationale Patentklassifikation:

C07K 14147 (2006 01) A61K 39/00 (2006 01)
C12N 15/63 (2006 01) G01N 33/68 (2006 01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2005/000455

(22) Internationales Anmeldedatum:
10 März 2005 (10 03 2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 015 179 2 25 März 2004 (25 03 2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): ONCOMAB GMBH [DE/DE], Friedr. Bergius-
Ring 15, 97076 Würzburg (DE)

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VOLLMERS, Heinz
[DE/DE], Budapesterstrasse 23, 97084 Würzburg (DE)
HENSEL, Frank [DE/DE], Am Exerzierplatz 1, 97070
Würzburg (DE)

(74) Anwalt: PÖHNER, Wilfried, Röntgenstr. 4, Postfach 63
23, 97013 Würzburg (DE)

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 27 Juli 2006

Zur Erklärung der Zweibuchstaben Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT Gazette verwiesen

(54) Title: ANTIGEN OF THE PM-2 ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: ANTIGEN DES PM-2 ANTİKÖRPERS UND DESSEN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a Polypeptide, which is expressed on the cell surface as a membrane-bound protein, is glycosylated at one or more points (membrane glycoprotein) and whose amino acid sequence corresponds partially or completely to that of the integrin binding protein p80 (accession # AJ131720) or REVI (accession # AF206019). The membrane glycoprotein is expressed by neoplastic cells and not by non-neoplastic cells and as an antigen specifically binds the human monoclonal antibody PM-2 (DSM number DSM ACC2600) and is in addition N-glycosidically and O-glycosidically linked. The invention also relates to a method for the isolation or production of the antigen and to the use of the latter for producing a medicament for immunization. The isolated antigen is also used to identify medicaments with an apoptotic or cell-proliferation inhibiting action. The invention also relates to the use of the membrane glycoprotein as a tumour marker.

(57) Zusammenfassung: Polypeptid, das als membranständiges Protein an der Zelloberfläche exprimiert wird, das an einer oder mehreren Stellen glykosyliert ist (Membranglykoprotein) und dessen Aminosäuresequenz teilweise oder ganz der des Integrin-Bindungsproteins p80 (Accession # AJ131720) oder REVI (Accession # AF206019) entspricht, wobei das Membranglykoprotein von neoplastischen Zellen und nicht von nicht-neoplastischen Zellen exprimiert wird, und als Antigen den humanen monoklonalen Antikörper PM-2 (DSM Eingangsnummer DSM ACC2600) spezifisch bindet, sowie N-glykosidisch und O-glykosidisch glykosyliert ist. Die Erfindung lehrt außerdem ein Verfahren zur Isolierung/Herstellung des Antigens und dessen Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung. Das isolierte Antigen dient auch zur Identifikation von Arzneimitteln mit apoptotischer oder Zellproliferationsinhibierender Wirkung und darüberhinaus der Verwendung des Glykomembranproteins als Tumormarker.

WO 2005/092922 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2005/000455

A. CLASSIFICATION ATTACHED COPY SUBJECTS SUBJECTS C07K14/47 C12N15/63 A61K39/00 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) onto both national Classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (Classification System followed by Classification Symbols) C07K C12N A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal , BIOSIS, WPI Data, Sequence Search, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	US 6 677 442 B1 (WANG ZHIGANG ET AL) 13 January 2004 (2004-01-13) Spalten 2,8; Claims 1-7; sequences 8,9 -----	1-21
X	WIXLER V ET AL: "Identification of novel interaction partners for the conserved membrane proximal region of alpha-integrin cytoplasmic domains" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 445, no. 2-3, 26 February 1999 (1999-02-26), pages 351-355, XP004259288 ISSN: 0014-5793 cited in the application the whole document & DATABASE NCBI WIXLER v: accession no. AJ131720 abstract ----- <div style="text-align: right;">-/--</div>	1-13,20, 21
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Special categories of cited documents</p> <p>*A* document defining the general State of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center;">31 March 2006</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center;">18/04/2006</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center;">Schmidt , Harald</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2005/000455

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	<p>GIBBS PEM ET AL.: "The function of the human homolog of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> REV1 is required for mutagenesis induced by UV light"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE USA, vol. 97, no. 8, 11 April 2000 (2000-04-11), pages 4186-4191, XP002374632 page 4187; figure 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13, 20, 21
A	<p>DE 102 30 516 A1 (MUELLER-HERMELINK, HANS KONRAD; VOLLMERS, HEINZ) 15 January 2004 (2004-01-15) cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE2005/000455

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 18 and 19 relate to a diagnostic method practiced on the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged properties of the Compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without the applicant justifying an additional fee, the Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2005/000455

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6677442	B1	13-01-2004	NONE	
DE 10230516	A1	15-01-2004	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/000455

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

C07K14/47

C12N15/63

A61K39/00

G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C07K C12N A61K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ⁰	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 677 442 B1 (WANG ZHIGANG ET AL) 13. Januar 2004 (2004-01-13) Spalten 2,8; Ansprüche 1-7; Sequenzen 8,9	1-21
X	WIXLER V ET AL: "Identification of novel interaction partners for the conserved membrane proximal region of alpha-integrin cytoplasmic domains" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 445, Nr. 2-3, 26. Februar 1999 (1999-02-26), Seiten 351-355, XP004259288 ISSN: 0014-5793 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument & DATABASE NCBI WIXLER v: accession no. AJ131720 Zusammenfassung	1-13, 20, 21

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

⁰ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

^A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

^E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

^L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

^O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

^P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

^T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

^X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

^Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

^Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. März 2006

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

18/04/2006

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schmidt, Harald

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/000455

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>GIBBS PEM ET AL.: "The function of the human homolog of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> REV1 is required for mutagenesis induced by UV light"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE USA,</p> <p>Bd. 97, Nr. 8,</p> <p>11. April 2000 (2000-04-11), Seiten 4186-4191, XP002374632</p> <p>Seite 4187; Abbildung 1</p> <p>-----</p>	1-13,20, 21
A	<p>DE 102 30 516 A1 (MUELLER-HERMELINK, HANS KONRAD; VOLLMERS, HEINZ)</p> <p>15. Januar 2004 (2004-01-15)</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2005/000455

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt

- 1 ☒ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

Obwohl sich die Ansprüche 18 und 19 auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen und/oder tierischen Körper vorgenommen werden kann, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
- 2 ☐ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
- 3 ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6 4 a) abgefaßt sind

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält

- 1 ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche
- 2 ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert
- 3 ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
- 4 ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung, diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/000455

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6677442	B1	13-01-2004	KEINE
DE 10230516	A1	15-01-2004	KEINE